

Screening von Thrombozytenkonzentraten auf bakterielle Kontaminationen: Diagnostische Methoden und aktuelle Entwicklungen

Einleitung

Das Risiko der Übertragung von viralen Infektionen wie der durch das Humane Immundefizienzvirus (HIV) oder von Virushepatitiden wie Hepatitis-A, -B und -C ist in den letzten Jahrzehnten signifikant reduziert worden. Dies ist vor allem auf die Einführung eines verpflichtenden Virus-Screenings mittels serologischer Detektion von Virus-Antigenen (HBsAg) bzw. Antikörpern gegen Virusbestandteile, dem Direktnachweis viraler Nukleinsäuren mit Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) und nicht zuletzt auf eine restriktivere Spenderauswahl zurückzuführen **(1)**. Hierdurch bedingt wird das Restrisiko einer transfusions-assoziierten Übertragung für z. B. HCV auf mittlerweile nur noch etwa 1:10,9 Mio. geschätzt **(2)**.

Bakterielle Kontaminationen, insbesondere von Thrombozytenkonzentraten (TK) und die Vermeidung von



Abbildung 1
Thrombozytenkonzentrate für mikrobiologische Kontrolle

transfusionsbedingten bakteriellen Infektionen (TBBI) stellen hingegen nach wie vor eine große Herausforderung in der Transfusionsmedizin dar. Der Grund hierfür liegt an einem fundamentalen Unterschied zwischen viralen und bakteriellen Kontaminationen: Die Replikation von Viren erfordert das Vorhandensein spezifischer vitaler Zellen, die in den entsprechenden Blutprodukten nicht oder nur noch in geringsten Mengen vorhanden sind. Die Konzentration der möglicherweise enthaltenen Viren kann somit als konstant betrachtet werden. Im Gegensatz dazu können selbst geringste Mengen an Bakterien durch exponentielle Vermehrung während der TK-Haltbarkeit zu einer klinisch relevanten bis lebensbedrohlichen Anzahl (bis zu 10^{10} Mikroorganismen und mehr pro TK-Beutel **(3)**) für den Transfusionsempfänger heranwachsen und somit extrem gefährliche Auswirkungen haben (Entwicklung einer Sepsis bis zum septischen Schock und einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC)).

Dieses Wachstum wird durch die Lagerungsbedingungen von TKs bei 22–24 °C unter ständiger Agitation, die für die Erhaltung der Thrombozytenfunktion unabdinglich sind, begünstigt. In Abhängigkeit von der Bakterienspezies können zusätzlich

Dr. Benjamin Müller, Dr. med. Volkmar Schottstedt
DRK-Blutspendedienst West gemeinnützige GmbH
Zentrallabor Hagen
Feithstraße 180-186
58097 Hagen

Zusammenfassung

Die Übertragung von bakteriellen Infektionen durch Transfusion von Thrombozytenkonzentraten (TKs) stellt trotz vielfältiger Maßnahmen (restriktive Spenderauswahl, verbesserte Hautdesinfektion, Verwurf der ersten Milliliter Vollblut) nach wie vor ein ungelöstes Problem in der Transfusionsmedizin dar. Da septische Komplikationen in Zusammenhang mit TKs besonders mit älteren Produkten beobachtet wurden, ist die Haltbarkeit von TKs im Jahr 2008 von 5 auf 4 Tage reduziert worden. Durch bakterielle Screening-Methoden kann sowohl die Blutproduktesicherheit erhöht als auch die Lagerungsdauer wieder auf die ursprünglichen 5 Tage verlängert werden. Der vorliegende Artikel gibt einen Überblick über die aktuellen diagnostischen Methoden für das Bakterienscreening von TKs sowie deren Anwendung im Routinelabor.

Summary

Transfusion-transmitted bacterial infection by platelet concentrates (PCs) remains an unresolved problem despite the implementation of several measures including improved donor selection, skin disinfection methods and the diversion of the first milliliters of whole blood. Since platelet-related septic complications have been observed particularly with older PCs the shelf life of PCs was reduced in 2008 from 5 to 4 days. Using bacterial screening methods can increase blood product safety and extend the storage period back to 5 days. This article gives an overview of the current diagnostic methods for bacterial screening of PCs and their applicability in a routine setting.

noch Endo- und/oder Exotoxine in hohen Konzentrationen enthalten sein, die die Situation weiter verschärfen (3). Wie in einer multi-zentrischen Studie der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes gezeigt werden konnte, beläuft sich das Risiko einer bakteriellen Kontamination eines TK auf etwa 1:1.412 (4). Es sollte aber auch erwähnt werden, dass eine bakterielle Kontamination nicht zwangsläufig zu einer bakteriellen Vermehrung führt. Neben der beobachteten Autosterilisation, bei der es durch intrinsische Faktoren im gespendeten Blut zu einem Absterben



Abbildung 2
Vorbereitung des BactiFlow-Systems

der Bakterien kommt, kann eine Proliferation, je nach Bakterienstamm und aufgrund von verschiedenen, im Einzelnen nicht bekannter Faktoren, unterbleiben oder erst mit großer



Abbildung 3
Cartridges des Pan Genera Detection (PGD) Assay mit negativem Ergebnis (links) und positivem Ergebnis für Gram negative (GN) Bakterien (rechts)

zeitlicher Verzögerung und unterschiedlicher Vermehrungsgeschwindigkeit auftreten.

Zahlreiche Maßnahmen wurden in den letzten Jahren ergriffen, die dazu beitragen sollen, dass es erst gar nicht zu einer Kontamination des Blutproduktes kommt. Hierzu zählen u. a.:

- Sorgfältige Spenderauswahl
- Effektive Hautdesinfektion
- Verwurf der ersten Milliliter entnommenen Blutes (*pre-donation sampling*, Votum 27 des Arbeitskreises Blut (AKB))
- Geschlossenes Beutelsystem mit *inprozess*-Kontrollen zur Detektion von Leckagen

Als ein Meilenstein für die bakterielle Sicherheit von Blutprodukten in Deutschland wird das im Jahr 1997 eingeführte Votum 16 „Mindestanforderungen zur Sterilitätstestung von Blutkomponenten“, des AKB angesehen. Das Ziel dieser Richtlinie war die verbindliche Festlegung von standardisierten Methoden im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle. Hierzu zählt neben einer konkreten Vorgabe über die Anzahl der zu testenden Produkte ($0,4 \times \sqrt{n}$,

wobei n die Anzahl der produzierten Produkte pro Einrichtung darstellt) auch der Probenziehungszeitpunkt (Verfallsdatum + max. 3 Tage) und die Definition der Rahmenbedingungen der mikrobiologischen Kontrolle (aerobe und anaerobe Kultivierung von 10 ± 1 ml Produktvolumen bei 30–37 °C für 14 Tage bei konventioneller Flüssigkultivierung bzw. 7 Tage bei automatisierten Testsystemen).

Ferner zählen hierzu auch eine Identifizierung der kontaminierenden Bakterienspezies sowie eine zweite Kultivierung aus dem gleichen Blutbeutel als Bestätigungstest (5). Als weiterer Schritt und basierend auf den gemachten Erfahrungen erfolgte im Jahr 2012 eine Überarbeitung des Votums 16 in Form des Votums 43 durch den AKB (6). Obwohl alle diese Maßnahmen zu einer deutlichen Reduktion der bakteriellen Kontaminationsrate von Blutprodukten geführt haben, sollten für ein vollständiges Bild folgende Punkte nicht unerwähnt bleiben: Die getroffenen Maßnahmen führen zum einen zu einem Verlust an TK („zerstörende Prüfung“) und es kann immer nur eine Stichprobenanzahl an Produkten überprüft werden.

Ferner lässt ein positiver Bakterienachweis (am Ende der Haltbarkeit) weder eine direkte Aussage zur Sicherheit während der Haltbarkeit noch eine gute Risikoabschätzung für den Empfänger im Falle einer Transfusion zu, da das erhaltene Prüfergebnis qualitativ (positiv/negativ ohne eine Mengenangabe der enthaltenen Bakterien) ist. Die klinische Symptomatik ist jedoch nicht nur von der Bakterienspezies sondern ebenso von der tatsächlich vorliegenden Keimzahl abhängig (7).

Anhand der Hämovigilanzdaten für Deutschland konnte gezeigt werden, dass nach wie vor schwerwiegende Transfusionsreaktionen beobachtet wurden. Zwischen 1997 und 2007 berichtete das Paul-Ehrlich-Institut über insgesamt 5 Todesfälle aufgrund einer bakteriellen Übertragung durch TK (8, 9). Diese erfolgten

nahezu ausschließlich mit Produkten nahe dem Verfallsdatum. Die hieraus resultierende Konsequenz war die Verkürzung der TK-Haltbarkeit im Jahre 2008 auf 4 Tage (4 x 24 h), beginnend ab Mitternacht des Entnahmetages (Votum 38 des AKB) (10). Trotz dieser Maßnahmen ist es im Jahr 2011 zu einer tödlichen septischen Transfusionsreaktion durch ein 4 Tage altes Pool-TK gekommen (11).

Ein zusätzlicher Sicherheitsgewinn kann durch Einsatz von Pathogen-Reduktionstechniken (PRT) oder der Testung auf bakterielle Kontaminationen vor Ende der Haltbarkeit erreicht werden. Daher ist, bei negativem Keimnachweis, eine Verlängerung der TK-Haltbarkeit um einen Tag auf die vor 2008 zulässigen 5 Tage wieder möglich. Eine Testung von TK oder anderen Blutprodukten im Sinne eines Screenings, welche zur Freigabe des Produktes führt, ist in Deutschland allerdings nicht vorgeschrieben. Speziell zu Beginn der Laufzeit erscheint ein solches Screening auch wenig sinnvoll. Die Keimbelastung, sofern vorhanden, unmittelbar nach der Spende wird im Allgemeinen auf etwa nur 10 bis 100 koloniebildende Einheiten (CFU)/TK-Beutel geschätzt. Bei einem mittleren Volumen von 300 ml/TK-Beutel entspricht dies 0,03 bis 0,3 CFU/ml. Die Gefahr, dass die untersuchte Probe

zu diesem Zeitpunkt aufgrund der geringen Anzahl von Mikroorganismen im TK keine Bakterien enthält und somit ein falsch-negatives Ergebnis erzielt wird, ist daher sehr groß (3).

Der vorliegende Artikel fokussiert auf die bislang möglichen bzw. angewandten Teststrategien im Routineeinsatz in Zusammenhang mit bakteriellen Kontaminationen von TK sowie auf die verschiedenen Vor- und Nachteile der jeweiligen Methoden. Nicht beleuchtet werden mikroskopische Untersuchungen nach GRAM- oder Fluoreszenzfärbungen, da diese unter Routinebedingungen kaum praktikabel sind. Methoden, die auf Surrogatmarkern wie pH oder Glucose basieren, werden ebenfalls nicht diskutiert, da diese unakzeptabel geringe Sensitivitäten von größer 10^7 oder 10^8 CFU/ml gezeigt haben (12).

Diagnostische Methoden – Bakterielle Screening Strategien

Die Anforderungen an einen diagnostischen Test zur Identifikation einer bakteriellen Kontamination in Thrombozytenkonzentraten sind vielfältig und an einigen Stellen schwierig miteinander zu vereinen. Der perfekte Test sollte neben einer extrem hohen diagnostischen Sensitivität und Spezifität, schnell und einfach durchführbar



Abbildung 4
BacT/ALERT 3D System

Methoden zum Bakterienscreening in Thrombozytenkonzentraten

| Kit (Hersteller) | Detektiionsprinzip | Analytische Sensitivität [CFU/ml] | Probenvol. [ml] | Hands-on-Time/ Time-to-Result | Referenzen |
|--|---|---|-----------------|---|-------------------------|
| BacT/ALERT (BioMérieux) | Kolorimetrische Bestimmung der CO ₂ -Produktion während der automatischen Kultivierung | 1 – 10 | 4 – 10 | 5 min/abhängig von der initialen Bakterienkonz. | (4, 14-16, 34-37) |
| Bactec (BD Biosciences) | Fluorimetrische Detektion der CO ₂ -Produktion während der automatischen Kultivierung | 1 – 10 | 4 – 10 | --- | (36, 38, 39) |
| VersaTrek (TrekDiagnostics) | Detektion von Druckänderungen in der Kulturflasche durch Gasverbrauch/Produktion | 10 – 20 | 4 | --- | (40) |
| Haemonetics eBDS (Haemonetics) | Elektrochemische Detektion des Sauerstoffverbrauchs am Ende der Kultivierung | 1 | 2 – 3 | ---/24–30 h | (34, 37, 39, 41, 42) |
| BactiFlow (BioMérieux) | FACS-basierte Detektion eines durch bakterielle Esterasen gespaltenen Farbstoffs | 150 | 1 | 5 min/1 h | (23, 27-29, 33, 43, 44) |
| 16S rDNA Real-time PCR | Amplifikation bakt. Nukleinsäuren und Echtzeit-Detektion mittels PCR | 35 | 1 | 30 – 60 min/4 h | (24, 25, 45) |
| Pan Genera Detection assay [PGD] (Verax Biomedical Inc.) | Lateral-Flow Immunopräzipitation von bakt. Lipopolysacchariden (LPS) bzw. Lipoteichonsäure (LTA) | 10 ³ – 10 ⁵ (gram +) 10 ³ – 10 ^{5*} (gram –) | 0,5 | 5 min/1,5 h | (26, 35, 46-48) |
| BacTx (Immugenetics) | Kolorimetrische Detektion von bakt. Peptidoglykanen | 10 ³ – 10 ⁴ | 1 | 1 h | (32) |

Tabelle 1

(modifiziert nach [22]).

sowie verlässlich und preisgünstig sein. Bislang gibt es allerdings keinen kommerziell verfügbaren Test, der **alle** diese Voraussetzungen erfüllt.

Aus diesem Grund sind in den vergangenen Jahren verschiedene Konzepte erarbeitet worden, die sich grob in zwei Kategorien einordnen lassen:

- Kultivierungsbasierte Methoden (*culture based methods*) in Kombination mit einer frühen (*negative-to-date* Konzept) oder späten Probenziehung
- Schnelltests (*rapid detection methods*) in Kombination mit einer späten Probenziehung (**Tabelle 1**)

a) Kultivierungsbasierte Methoden

Die Freigabe von TK erfolgt in vielen europäischen (z. B. Niederlande) wie auch außereuropäischen Ländern (z. B. USA, Australien) (**13-16**) nach dem „negative-to-date“ Konzept mithilfe automatisierter Kultivierungssysteme. Aufgrund des bakteriellen Wachstums, welches abhängig von der eingesetzten Kultivierungsmethode und der inokulierten, in der Regel sehr geringen Keimzahl ist, können teilweise mehrere Tage bis zur Detektion eines Signals vergehen. Daher erfolgt bei diesem Vorgehen die Probenziehung im Allgemeinen

ca. 24 h nach der Spende, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, kontaminierende Mikroorganismen im untersuchten Aliquot nachzuweisen und gleichzeitig noch eine akzeptable Zeitspanne für die Detektion eines Signals zu haben. Hierzu werden etwa 4–10 ml Thrombozytenkonzentrat in einer aeroben und zusätzlich in einigen Ländern in einer anaeroben Kultivierungsflasche inokuliert und für bis zu 7 Tage bei 35–37 °C inkubiert. Die Freigabe der Thrombozytenkonzentrate erfolgt nach dem aktuellen (negativen) Status der Kultivierung zum Zeitpunkt der Abgabe an medizinische Einrichtungen, wird aber trotzdem bis zum Ende von Tag 7

weitergeführt. Im Fall eines reaktiven/positiven Signals nach Frei- bzw. Ausgabe der Präparate muss die transfundierende Institution benachrichtigt und das betroffene Produkt zurückgerufen werden; bei bereits erfolgter Transfusion ist die Einleitung eines *look-back* Verfahrens obligat.

Das Risiko bei dieser Vorgehensweise besteht vor allem in der nicht zu unterschätzenden Wahrscheinlichkeit eines Probenahmefehlers, die etwa im Bereich von 1:14.000 bis 1:50.000 liegt und einem damit einhergehenden falsch-negativen Ergebnis, wie es unter anderem aus den Niederlanden und den USA berichtet wurde (15, 17-19). Der Grund hierfür ist vor allem die geringe Anzahl von Bakterien zu frühen Zeitpunkten der Probenziehung. Kultivierungsmethoden gelten generell als der „goldene Standard“, da ihre analytische Sensitivität mit weniger als 10 CFU/ml extrem hoch ist. In Verbindung mit dem „negative-to-date“ Konzept ist die diagnostische Sensitivität jedoch deutlich geringer, da ein nicht unerheblicher Teil der TK-Produkte zum Zeitpunkt eines positiven Signals bereits transfundiert wurde.

Auf der anderen Seite kann es zu einem erhöhten Verwurf an Produkten kommen, da auch wenig transfusionsrelevante Bakterien oder

sehr niedrige Titer erfasst werden. Als zur normalen Hautflora gehöriger Keim wird z. B. *Propionibacterium acnes* häufig in TK detektiert. Dieser kann sich jedoch als obligatorischer Anaerobier aufgrund der Lagerung von TK in gaspermeablen Beuteln dort nicht vermehren (20, 21). Überdies kann es auch zur Detektion von Bakterien kommen, die gewöhnlich durch Autosterilisation während der TK-Lagerung absterben (22).

Derzeit sind drei automatisierte Kultivierungsmethoden im Routineeinsatz bzw. wurden für die TK-Qualitätskontrolle validiert:

- BacT/ALERT System (Biomérieux, Frankreich):
Überwachung der CO₂-Produktion während des bakteriellen Wachstums (Farbänderung eines gaspermeablen Sensors am Boden der Kulturflasche von grau nach gelb)
- BacTec (BD Diagnostik, USA):
Fluorimetrische statt colorimetrische Detektion. Ansonsten sehr ähnlich zum BacT/ALERT-System
- VersaTrek (Trek Diagnostik, USA):
Detektion von Druckänderungen im Gasraum der Blutkulturflasche

Eine weitere derzeit in der Diskussion befindliche Strategie ist die Kombination von Kultivierungsmethoden mit einer späten Probenziehung, die von

Sireis *et al.* mittels des BacT/ALERT Systems vorgeschlagen und in einer initialen Studie untersucht wurde (23). Hierbei wurden Bakterienstämme mit schnellen und stabilen Wachstumseigenschaften für Spike-Experimente verwendet. Eine Probenziehung nach einer Lagerdauer von 3 Tagen erforderte teilweise eine verhältnismäßig lange Mindestinkubationszeit im BacT/ALERT-System von ca. 12 h bis zur Detektion eines positiven Signals.

b) Schnelltests zum direkten Nachweis von Bakterien in Kombination mit einer späten Probenziehung

Neben den Kultivierungsmethoden bieten Schnelltests eine weitere Alternative zur Detektion von transfusionsrelevanten Bakterientitern in TK. Generell gilt hierbei, dass durch die spätere Probenziehung (in der Regel im Verlauf des letzten Drittels der

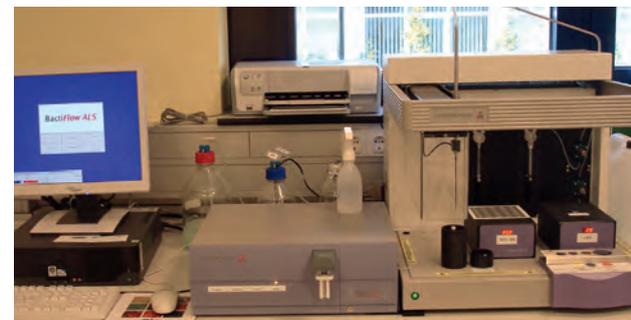


Abbildung 5
BactiFlow-Gerätesystem

TK-Haltbarkeit), die durch die Schnelltestmethoden ermöglicht werden, die Bakterientiter im TK höher und damit der Fehler bei der Probenahme geringer ist. Von der methodischen und technologischen Herangehensweise unterscheiden sich diese Strategien hingegen teilweise erheblich.

Hierzu zählen u. a.:

- molekularbiologische Methoden: 16S bzw. 23S rDNA-*Real-time* PCR für den Direktnachweis bakterieller DNA in TKs
- Lateral-Flow-Immunopräzipitation (Pan Genera Detection Assay,

- Durchflusszytometrische Methoden
- BacTx-Assay (Immunogenetics, Boston, MA, USA): qualitative colorimetrische Detektion von bakteriellen Zellwandbestandteilen (Peptidoglycan)

Jede dieser Strategien hat Vor- und Nachteile, die im Folgenden kurz beleuchtet werden sollen.

Real-Time PCR

In zahlreichen Publikationen wurde über die Entwicklung und Anwendung der 16S- bzw. 23S rDNA *Real-time* PCR zur Detektion von bakteriell kontaminierten TK mit einer analytischen Sensitivität im Bereich von 5 – 50 CFU/ml berichtet (24, 25). Neben einem vergleichsweise hohen apparativen Aufwand ist diese Methode relativ kostenintensiv und erfordert speziell geschultes Personal. Ferner stellt diese Form des bakteriellen Nachweises extrem hohe Anforderungen an die Reinheit der verwendeten Reagenzien. Insbesondere sind hier die in der PCR zum Einsatz kommenden Polymerasen zu nennen. Da diese Enzyme rekombinant mithilfe von Bakterien hergestellt werden, sind diese oft nicht frei von bakterieller genomischer DNA, wodurch es zu falsch-positiven Resultaten kommen kann (24).

Pan Genera Detection Assay (PGD)

Das Testprinzip des Pan Genera Detection Assays beruht auf der Immunopräzipitation von bakteriellen Zellwandbestandteilen (LPS bzw. LTA) in Kombination mit einer chromatographischen Auftrennung (*lateral-flow immunoprecipitation*) (26). Die Vorteile dieses Testes bestehen darin, dass er leicht und mit einem Minimum an Laborequipment durchführbar ist und somit einem *Bedside-* oder *Point-of-Issue* Test am nächsten kommt. Demgegenüber stehen eine vergleichsweise geringe Sensitivität von 10^3 – 10^4 CFU/ml für Gram-positive und 10^3 – 10^5 CFU/ml für Gram-negative Stämme (27). Bei einigen Gram-negativen Bakterien wurde sogar eine LOD (limit of detection) von mehr als 10^6 CFU/ml beobachtet (26). Weitere Nachteile sind die hohen Kosten, eine hohe Rate an falsch-positiven Resultaten, wodurch es zu einem unnötig hohen Verwurf an TK-Produkten kommt sowie die (noch) notwendige subjektive und daher fehleranfällige visuelle Ergebnisinterpretation.

Durchflusszytometrische Methoden

Die Markierung potentiell im TK vorhandener Bakterien mit fluoreszie-

Anforderungen an einen Screeningtest für Bakterien in Blutprodukten

- Schnell und leicht durchführbar
- Verlässlich und einfach interpretierbar
- Nachweis klinisch relevanter Pathogene
- Geringe Probenmenge
- Hohe Sensitivität und Spezifität
- Akzeptable Kosten
- (Anbindung an EDV-System)

Verax Biomedical Inc., Worcester, MA, USA): Detektion von bakteriellen Zellwandbestandteilen (Lipopolysaccharide (LPS) bzw. Lipoteichonsäure (LTA))

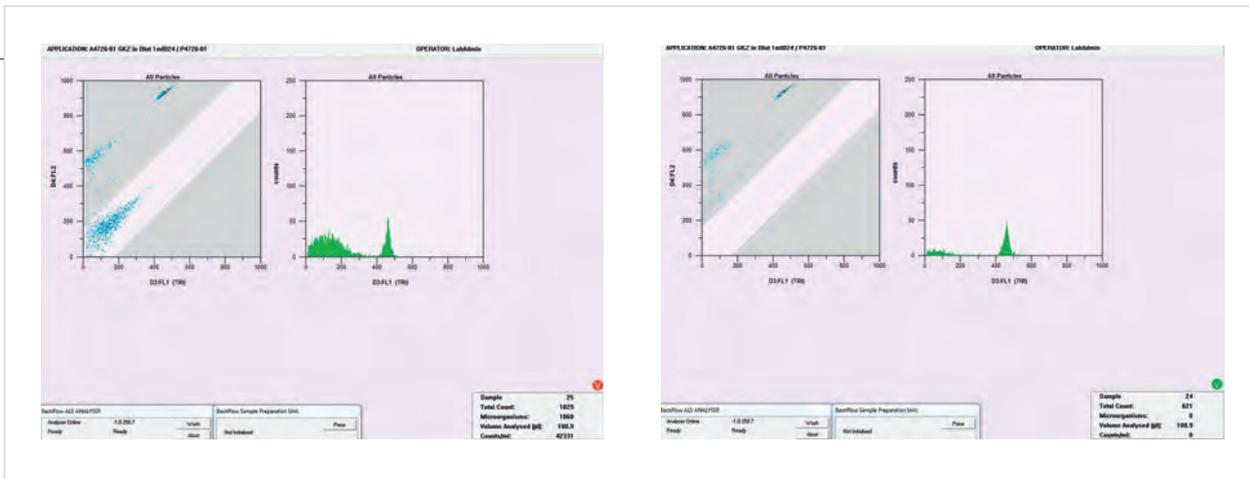


Abbildung 6

Ergebnisdarstellung BactiFlow-Analyse: DotBlot bzw. Histogramm

renden Farbstoffen und der anschließenden Detektion und Quantifizierung im Durchflusszytometer stellt eine weitere alternative Möglichkeit dar. Eine von Sireis *et al.* evaluierte *in-house*-Methode nutzt hierfür die Markierung von Thrombozyten mithilfe PE-markierter anti-CD61 Antikörper (BD Bioscience) (23). Bakterien werden hingegen mit dem Farbstoff Thiazol Orange angefärbt. Aufgrund der Emission unterschiedlicher Lichtwellenlängen können so Thrombozyten von Bakterien im Durchflusszytometer unterschieden und quantifiziert werden. Im Jahr 2009 wurde von Dreier *et al.* ein weiteres auf der Durchflusszytometrie basierendes System vorgestellt, das ursprünglich für die mikrobiologische Überwachung von Lebensmitteln entwickelt wurde.

Dieser als BactiFlow bezeichnete Assay basiert auf der Zugabe eines zunächst nicht-fluoreszierenden Fluorochromes zu einer Probe des TK.

Der Farbstoff passiert passiv die Zellmembran der Bakterien und wird durch die enzymatische Aktivität intrazellulärer Esterasen gespalten. Durch diese Modifikation kann der nun fluoreszierende Farbstoff die Bakterienzelle nicht mehr verlassen und daher mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Die analytische Sensitivität dieses Testes wird mit 150 – 500 CFU/ml angegeben (28). Diese Technologie wird derzeit auch im DRK-Blutspendedienst West zur Untersuchung von TK-Proben angewandt, die am Ende des 3. Tages der Haltbarkeit gezogen werden. Die Verwendung von TK-Präparaten, die mit dieser Methode getestet und für unbedenklich befunden wurden, darf mit Genehmigung des Paul-Ehrlich-Instituts, von 4 auf die ursprünglichen 5 Tage verlängert werden.

Obwohl sich die betroffenen Präparate während des Analysenzeitraums in Quarantäne befinden, ergibt sich keine spürbare Einschränkung der

Versorgung, da die Untersuchungen während der Nachtstunden erfolgen und der Bedarf an TK-Produkten in diesem Zeitraum im Allgemeinen sehr gering ist. Außerdem ist der Zeitbedarf für die Durchführung der Untersuchungen mit ca. 2,5 bis 3 h sehr kurz.

Wie in einer kürzlich publizierten Studie des DRK-BSD West gezeigt werden konnte, kann dieses System maßgeblich zu einer Verbesserung der Sicherheit von TK-Produkten beitragen. Von 34.631 getesteten Produkten während des Studienzeitraumes von 25 Monaten konnten insgesamt 12 bestätigt mit Bakterien kontaminierte TK-Produkte identifiziert und aus dem Verkehr gezogen werden. Die hierbei identifizierten Keime waren *S. epidermidis* (4x), *S. dysgalactiae ssp. equisimilis* (1x), *S. aureus* (2x) und *B. cereus* (5x) (29). Insbesondere *B. cereus* ist dafür bekannt Pathogenreduktionstechniken widerstehen zu können (30).

BacTX

Der BacTx-Assay ist eine qualitative, auf colorimetrischer Detektion von Peptidoglykan (Bestandteil bakterieller Zellwände) basierende Schnellmethode zur qualitativen Detektion von Bakterien. Die Sensitivität dieser Methode wurde mit etwa 10^4 CFU/ml und einem *Time-to-Result* von etwa einer Stunde (31) beschrieben. Im Jahr 2012 wurde dieser Test durch die FDA (Food and Drug Administration) in den USA zugelassen. Heaton *et al.* haben in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass dieses System prinzipiell für die Anwendung kurz vor der Transfusion geeignet ist (32).

Bewertung und Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Methoden und Strategien entwickelt, die zu einer deutlichen Reduktion von bakteriellen Kontaminationen von TK-Präparaten geführt haben. Trotz all dieser Bemühungen stellen bakterielle Kontaminationen von TKs nach wie vor ein großes Risiko in der Transfusionsmedizin dar. Die Beobachtung, dass tödliche Septikämien in Zusammenhang mit TK-Transfusionen in Deutschland nahezu ausschließlich mit Präparaten am Ende ihrer Halt-

| Sample ID | Time | Lot Nr | Sampling | Manuf. | Comments | Counts/ml |
|-----------|----------|--------|----------|--------|----------|-----------|
| 09 | 04:34:40 | | | | | 119 |
| 10 | 04:37:40 | | | | | 0 |
| 11 | 04:40:41 | | | | | 0 |
| 12 | 04:43:41 | | | | | 40 |
| 13 | 04:46:41 | | | | | 40 |
| 14 | 04:49:41 | | | | | 0 |
| 15 | 04:52:41 | | | | | 40 |
| 16 | 04:55:41 | | | | | 0 |
| 17 | 04:58:41 | | | | | 0 |
| 18 | 05:01:41 | | | | | 159 |
| 19 | 05:04:41 | | | | | 0 |
| 20 | 05:07:41 | | | | | 119 |
| 21 | 05:10:42 | | | | | 79 |
| 22 | 05:13:42 | | | | | 40 |
| 23 | 05:16:42 | | | | | 1189 |
| 24 | 05:19:42 | | | | | 0 |
| 25 | 05:22:42 | | | | | 42331 |

Abbildung 7

Ergebnisdarstellung BactiFlow-Analyse in absoluten Counts/ml mit positiven (rot) und negativen (grün) Resultaten

barkeit beobachtet wurden, haben dazu geführt, dass das Paul-Ehrlich-Institut die Haltbarkeit dieser Produkte auf vier Tage (4 x 24 h, gerechnet ab Mitternacht des Entnahmetages) reduziert hat.

Eine Verkürzung der Haltbarkeit der Präparate stellt auf der anderen Seite für Blutspendedienste immer eine Herausforderung für die Sicherstellung der Versorgung mit diesen Produkten dar, insbesondere während der Ferienzeit und/oder während der Feiertage. Um dieser Herausforderung begegnen zu können und zusätzlich die Sicherheit zu erhöhen, sind *Screening*-Methoden mit bei negativem Ergebnis einhergehender Verlängerung der maximalen TK-Haltbarkeit um einen Tag, ein adäquates Mittel, das aber immer nur

einen Kompromiss darstellen kann. Ein besonders kritischer und nach wie vor kontrovers diskutierter Punkt, der für alle *Screening*-Methoden gleichermaßen gilt, ist der optimale Zeitpunkt für die Probenziehung. Eine frühe Probenziehung (Tag 1–2) erhöht das Risiko eines Probennahmefehlers bedingt durch die sehr geringe Konzentration an Bakterien im Produkt zu Beginn der Lagerung.

Eine Beprobung zu einem späteren Zeitpunkt birgt hingegen das Risiko, das zuvor einige kontaminierte Produkte ohne Testung transfundiert wurden und somit eine bakterielle Kontamination unentdeckt bleibt. Insbesondere bei schnell wachsenden Keimen kann dies beim Empfänger eine mitunter schwerwiegende oder fatale Transfusionsreaktion/

Sepsis zur Folge haben. Weitere angedachte Strategien umfassen ein *Screening* an Tag 2 und 4, wodurch möglicherweise das diagnostische Fenster für schnell wachsende Bakterien verkürzt und die Wahrscheinlichkeit für die Detektion von langsam wachsenden Bakterien erhöht wird. Neben den daraus resultierenden logistischen Herausforderungen, allein durch die Anzahl der zu testenden Präparate an Tag 2, würden an Tag 1 und 2 transfundierte kontaminierte TK nach wie vor unentdeckt bleiben. Noch stringenter Teststrategien, wie



Abbildung 8
Probenvorbereitung für Messung im BactiFlow-System

z. B. eine tägliche Testung, würden zum einen die logistischen Herausforderungen weiter erhöhen und zum anderen neben einem signifikanten Verlust an Produktvolumen auch die Gefahr einer Sekundärkontamination weiter erhöhen. Eine umfassende Darstellung dieser Problematik kann einem Artikel von Vollmer *et al.* in Zusammen-

arbeit mit dem DRK-Blutspendedienst West entnommen werden (33).

Der Einsatz von Kulturautomaten im Rahmen der Qualitätskontrolle von TK wird nach wie vor als ein Meilenstein angesehen. Auch im Rahmen des *Screenings* lassen sich Kultivierungsmethoden leicht in die Zeitschiene und logistischen Abläufe von Blutbanken integrieren. Da sie aber überwiegend nach dem *negative-to-date* Konzept eingesetzt werden, erfolgt dies im Allgemeinen in einer Kombination mit einer frühen Probennahme. Hierbei nimmt man zum einen zwangsläufig ein höheres Risiko für einen Probennahmefehler in Kauf und zum anderen eine mitunter lange Zeit für ein Signal, da alle Kultivierungs- oder Inkubationsmethoden auf bakterielles Wachstum angewiesen sind.

Schnellmethoden liefern hier deutlich früher ein Resultat und werden daher im Allgemeinen mit einer späten Probennahme kombiniert, wodurch das Risiko eines Probennahmefehlers nicht auszuschließen ist aber zumindest deutlich reduziert werden kann. Anfängliche Bedenken bezüglich der Integration in den Arbeitsablauf und die Logistik von Blutbanken konnten weitestgehend ausgeräumt werden. Dass eine Integration auch in einem großen, zentrali-

sierten Labor gut zu realisieren ist, konnte in einer kürzlich erschienenen Publikation für das BactiFlow-System gezeigt werden (29). Auch die Akzeptanz dieses Systems sowie von *Real-time* PCR-Methoden durch das Paul Ehrlich-Institut, die nach negativer Testung der TK-Präparate eine Verlängerung der Haltbarkeit auf 5 Tage zulässt, zeigt die Eignung dieser Methoden für ein Routinescreening auf bakterielle Kontaminationen von TK-Präparaten. Zur weiteren Erhöhung des Qualitätsstandards sowie zur kontinuierlichen Überprüfung der eingesetzten Schnellmethoden ist seit kurzem auch eine externe Qualitätssicherung im Rahmen von Ringversuchen etabliert worden (27).

Abschließend lässt sich feststellen, dass das *Screening* auf bakterielle Kontaminationen von TKs zum einen einen deutlichen Beitrag zur Erhöhung der Sicherheit dieser Produkte liefert und zum anderen, durch Verlängerung der Haltbarkeit um einen weiteren Tag, die Versorgungssicherheit für Patienten mit diesen Präparaten, insbesondere während der Ferienzeit und an den Wochenenden, verbessert.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk-haemotherapie.de